

氏名（本籍）	くまい じゅん 熊井 準（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 275 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ヒトラミニン $\alpha 5$ 鎖 G ドメインの生物活性部位の同定と高活性なペプチド-多糖マトリックスの開発
論文審査委員	（主査） 教授 野水 基義 教授 林 良雄 教授 佐藤 隆

## 論文内容の要旨

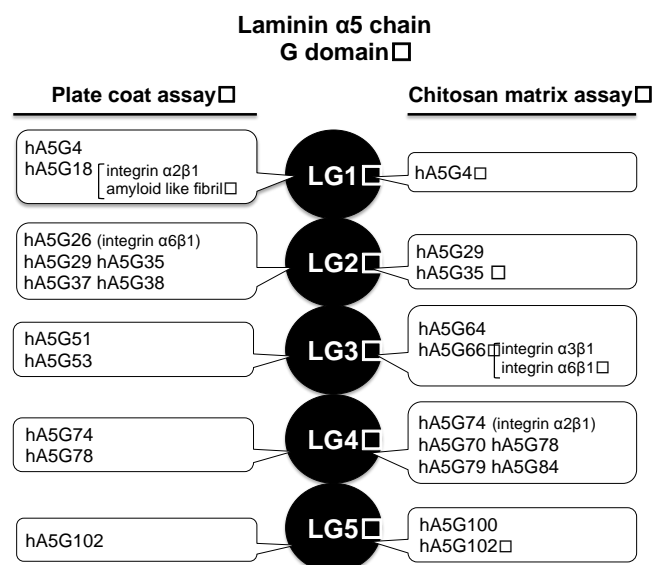
基底膜は、血管、筋肉細胞、神経細胞の周囲や表皮下など、全身に広く分布している薄い膜状の細胞外マトリックス（ECM）で、IV 型コラーゲン、ラミニン、ナイドジェン、パールカンなどから構成されている。これらの構成成分が互いに結合してマトリックスを形成し、組織の構造的支持のみならず個体の発生や修復など様々な生命現象に関与している。基底膜の主要な構成成分であるラミニンは、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の 3 つのサブユニットからなり、それらが会合した十字架構造のヘテロ 3 量体の糖タンパク質である。これまでに、5 種類の  $\alpha$ 鎖（ $\alpha 1-5$ ）、3 種類の  $\beta$ 鎖（ $\beta 1-3$ ）、3 種類の  $\gamma$ 鎖（ $\gamma 1-3$ ）が同定されており、各々のサブユニットの組み合わせから 19 種類のラミニンアイソフォームが報告されている。ラミニンは、細胞接着や遊走、血管新生、神経突起伸長など様々な生物活性を有し、基底膜の機能の中心的な役割を担っている。また、ラミニン  $\alpha$ 鎖 C 末端の球状ドメイン（G ドメイン）には、多くの生物活性部位が存在することが報告されており、重要な役割を担う領域であると考えられている。

近年、ECM、特に基底膜を模倣したバイオマテリアルの開発が盛んに行われており、再生医療のためのツールとして注目されている。マウス肉腫由来の基底膜成分抽出物であるマトリゲルが理想的な細胞培養基材として汎用されている。しかし、マトリゲルはマウス肉腫由来であるため、ヒトへの臨床応用は不可能で、組織工学においてマトリゲルと同等な機能を有する基底膜様のバイオマテリアルの開発が求められている。野水らは、基底膜機能を模倣したバイオマテリアルの開発を目指し、ラミニン由来の細胞接着ペプチドをキトサンやアルギン酸などの多糖に固定化したペプチド-多糖マトリックスを開発してきた。これらのペプチド-多糖マトリックスは、ペプチドが認識する受容体特異的に細胞に対して作用することが明らかになってきた。そのため、ラミニンの生物活性部位を同定することは、組織工学に応用可能なバイオマテリアルを

本論文第 1 章では、ヒト ES/iPS 細胞の培養基質として利用されているヒトラミニン-511 の中で重要な役割を担っている G ドメインに注目し、ヒトラミニン $\alpha$ 5 鎖 G ドメインを網羅する合成ペプチドを用いて、生物活性部位の同定を行った。第 2 章では、ペプチド・多糖マトリックスと細胞表面受容体との相互作用を制御して高活性なバイオマテリアルを開発することを目的に、ペプチドと多糖を繋ぐスペーサーが生物活性に及ぼす影響を解析した。

第1章では、ヒトラミニン $\alpha 5$ 鎖Gドメインの生物活性部位の同定を目的に、ペプチドをプレートにコートする方法とペプチドをキトサンマトリックスに固定化したペプチド-キトサンマトリックス

次に、ペプチドをプレートにコートする方法でヘパリンとEDTAを用いた細胞接着阻害実験を行ったところ、2種類(hA5G18, hA5G26)のペプチドがEDTAのみで細胞接着活性が阻害された。さらに、抗インテグリン抗体を用いた細胞接着阻害実験から、hA5G18はインテグリン $\alpha 2\beta 1$ 、hA5G26はインテグリン $\alpha 6\beta 1$ を介して細胞と相互作用することが示唆された。また、hA5G18は、電子顕微鏡を用いた解析からアミロイド様線維を形成することがわかった。そこで、hA5G18の短縮ペプチドを用いて、コングレ



ッド染色によるアミロイド様線維形成能を評価したところ、N末端側に位置するFVIFYVG配列がアミロイド様線維形成の活性中心配列であることが示唆された。

ペプチドをキトサンマトリックスに固定化する方法で、ヘパリンとEDTAによる細胞接着阻害実験を行ったところ、2種類 (hA5G66, hA5G74) のペプチドがEDTAのみで細胞接着活性が阻害された。また、抗インテグリン抗体による細胞接着阻害実験から、hA5G66-キトサンマトリックスはインテグリン $\beta 1$ を介して、hA5G74-キトサンマトリックスはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介して細胞と相互作用していることが示唆された。

ヒト ES/iPS 細胞の培養に使用されるヒトラミニン-511 の部分タンパク質であるヒトラミニン-511E8 フラグメントは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ およびインテグリン $\alpha 6\beta 1$ に結合することが報告されている。このインテグリン結合活性は、G ドメインの LG3 モジュールを削除することで消失するため、LG3 モジュールがインテグリンとの結合に重要な役割を担っていると考えられている。そこで、この LG3 モジュール部分に存在する hA5G66 (DLQQNLGSVNVS) に注目し、hA5G66 の短縮ペプチドを合成し、生物活性を評価した。その結果、N 末端から 4 残基短くした hA5G66d (NLGSVNVS) を固定化したキトサンマトリックスは、hA5G66-キトサンマトリックスに比べ強い細胞接着活性を示し、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ およびインテグリン $\alpha 6\beta 1$  と相互作用することがわかった。また、C 末端側から 3 残基目の Asn<sup>3287</sup> がインテグリンとの結合に重要であることが示された。以上の結果から、ラミニン-511 およびラミニン-511E8 フラグメントのインテグリンを介した細胞との相互作用に、hA5G66d の配列が重要な役割を担っている可能性が示された。本章では、ヒトラミニン $\alpha 5$  鎖 G ドメインから 18 種類の生物活性ペプチドを同定した。ペプチドをプレートにコートする方法と、ペプチドをキトサンマトリックスに固定化したペプチド-キトサンマトリックスを用いる方法では、ペプチドによって生物活性が異なることがわかった。これらのペプチドは多様な機能を有するラミニンの分子メカニズムを解明する上で、有用なツールとなることが期待される。また、hA5G66d-キトサンマトリックスは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ およびインテグリン $\alpha 6\beta 1$ を介して細胞と相互作用していることから、ヒト ES/iPS 細胞の培養基材としての応用が期待できる。

## 第 2 章 ペプチド-多糖マトリックスの生物活性に及ぼすスペーサー効果 1)

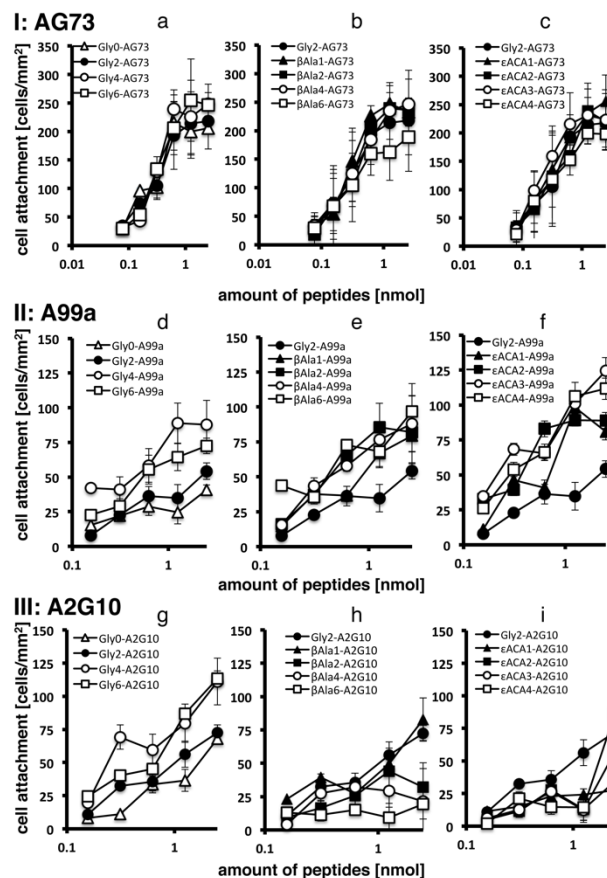
ペプチド-多糖マトリックスと細胞表面受容体の相互作用を制御して高活性なバイオマテリアルを開発することを目的に、ペプチドと多糖を繋ぐスペーサーの長さや物理的性質が生物活性に及ぼす影響を検討した。Gly (3.67 Å/residue),  $\beta$ Ala (4.86 Å/residue),  $\epsilon$ ACA (8.70 Å/residue)からなる種々のスペーサーを導入したペプチド-キトサンマトリックスを作製した。シンデカンに結合する AG73 を固定化したキトサンマトリックスは、どのスペーサーを導入しても細胞接着活性は変化しなかった (Fig. 2)。一方、インテグリンに結合する A99a-および A2G10-キトサンマトリックスは、スペーサー依存的な細胞接着活性を示した。親水性の Gly スペーサー

(Gly2, Gly4) を導入すると, A99a-および A2G10-キトサンマトリックスの細胞接着と細胞伸展は促進した. しかし, Gly6 スペーサーを導入した A99a-および A2G10-キトサンマトリックスは細胞接着活性が低下した. このことから, インテグリンとペプチドの相互作用にはスペーサーの長さや物理的性質が重要であることが示唆された.  $\beta$ Ala および  $\epsilon$ ACA などの疎水性スペーサーを A99a-キトサンマトリックスに導入した場合, スペーサーを導入しない場合に比べ細胞接着活性と細胞伸展活性が飛躍的に増強された. 一方, Gly4 (Gly4: 14.68 Å) と同程度の長さのスペーサー ( $\beta$ Ala3: 14.58 Å,  $\epsilon$ ACA2: 17.40 Å) を導入させた A2G10-キトサンマトリックスは, 活性が低下した. これは, スペーサーのアルキル鎖によって疎水性が増加し, ペプチドがキトサンマトリックスの中に移動したことやペプチドのコンフォメーションが変化したことが考えられる. 以上の結果から, 受容体特異的なペプチド, 多糖マトリックス, スペーサーの組み合わせの最適化は, 高活性なペプチド-多糖マトリックスのデザインに重要で, 組織工学に応用可能な受容体特異的に作用するバイオマテリアルの開発を可能にするものであることが示された.

本論文では, ヒトラミニン $\alpha$ 5鎖 G ドメイン (LG1-LG5) 由来の 115 種類の合成ペプチドを用いたスクリーニングから, 18 種類の生物活性配列を同定した. G ドメインの LG3 モジュールに位置する NLGSVNVS は, インテグリン $\alpha$ 3 $\beta$ 1およびインテグリン $\alpha$ 6 $\beta$ 1を介した細胞を促進した. さらに, ペプチド-多糖マトリックスにおいて, ペプチドと多糖の間のスペーサーの長さや物理的性質を最適化することで強い生物活性を有するバイオマテリアルをデザインできることを見出した. 本研究で得られた結果は, ラミニンの機能を模倣したバイオマテリアルの開発と, 組織工学などへの応用が期待できる.

## 【研究結果の掲載誌】

1) *Biopolymers*, **106**, 512-520 (2016).



**Fig. 2. Cell attachment activity of peptide-chitosan matrices with various**

## 論文審査の結果の要旨

組織工学研究において、細胞の足場として物理的にも生物学的にも機能性に優れ、生体適合性を有するバイオマテリアルの開発は大きな課題の一つである。本申請論文は、第 1 章において、ヒト ES/iPS 細胞の培養基質として凡用されるヒトラミニン-511 の中で重要な役割を担っているヒトラミニン $\alpha 5$  鎖 G ドメインに注目し、G ドメインを網羅する合成ペプチドを用いて生物活性部位を明らかにした。第 2 章において、ペプチド-多糖マトリックスと細胞表面受容体との相互作用を制御して高活性なバイオマテリアルを開発することを目的に、ペプチドと多糖マトリックスを繋ぐスペーサーが生物活性に及ぼす影響を解析した。

第 1 章では、115 種類の合成ペプチドを合成し、プレートにコートする方法およびキトサンマトリックスに共有結合する方法を用いて 18 種類の細胞接着活性配列を同定した。ペプチドをプレートにコートする方法のみで細胞接着活性を示した。

hA5G18 はアミロイド様線維を形成し、インテグリン $\alpha 2\beta 1$  を介して細胞と相互作用することを示した。ペプチド-キトサンマトリックスのみで活性を示した hA5G66 の短縮ペプチドを共有結合した hA5G66d-キトサンマトリックスは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$  および $\alpha 6\beta 1$  を介して細胞接着を誘導することがわかり、バイオマテリアルのリガンドとして有用であることを示した。第 2 章では、スペーサーの長さや物理的性質を変え、受容体の異なるペプチドを固定化させたペプチド-多糖マトリックスの生物活性を評価した。インテグリンを介する生物活性はスペーサーの影響を強く受け、シンデカンを介する生物活性はスペーサーの影響を受けにくいことがわかり、目的の細胞やレセプターに合わせてスペーサーを最適化することで、高活性なバイオマテリアルを開発できることを明らかにした。

本研究にて得られた知見は、組織工学への応用を目指した受容体特異的で高活性なバイオマテリアルの開発に有益な知見を与えるものである。

以上、本申請論文は、新規性・応用性もあり、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと判断できる。